

論文審査の結果の要旨

氏名 安彦 行人

本論文は4章からなり、第一章はツメガエルの *inv* (*Xinv*)の遺伝子のクローニングとその発現パターン、第二章は *Xinv* のアンチセンスのモルフォリーノオリゴを用いた機能阻害実験、第三章はマウスの *inv* の過剰発現によって生じるツメガエル胚の左右非対称性の効果、第四章は *inv* の蛋白質がカルモジュリンに結合することについて述べられている。脊椎動物の体は外見的には左右相称であるが、体内の器官の形態、配置には左右非対称性が見られる。これらの遺伝子の左右非対称な発現をもたらす初期の機構はいまだ解明されていない。その中においてマウス *inv* 変異体は、ホモ接合体のほぼ100%で内臓逆位が観察され、*nodal* などの遺伝子発現部位も左から右へと逆転することが知られている。このことから *inv* 遺伝子は、左右非対称な発現を示す遺伝子群の上流で働くことが示唆される。すでにマウスおよびヒトにおいて *inv* 遺伝子がクローニングされているが、安彦氏はアフリカツメガエルの *inv* 関連遺伝子をクローニングした。アフリカツメガエル cDNA ライブラリーから、2種類の *inv* 関連遺伝子 (*Xinv-1*, *Xinv-2*) を単離した。アフリカツメガエル *inv* (*Xinv*) とマウス *inv* のアミノ酸配列を比較した結果、15個のアンキリンリピートと呼ばれるモチーフに加え数カ所、相同性の高い領域が見出された。これらのうち2ヶ所は、IQ モチーフと呼ばれるカルモジュリン結合配列に約70%の相同性を持ち、カルモジュリン結合に必須とされるイソロイシン-グルタミン(IQ)配列も保存されていることを明らかにした。更に RT-PCR による解析の結果、アフリカツメガエル初期胚において *Xinv-1* mRNA は受精卵からすでに存在し、発生過程で大きな量的変動なく存在し続けることが示された。また、Whole mount *in situ* hybridization により、*Xinv* mRNA は卵割期から孵化にいたるまで、*Xnr-1* などと異なり左右に均等に発現していることが観察された。次に morpholino antisense oligonucleotide を用いて *Xinv-1*, *Xinv-2* の遺伝子特異的な翻訳阻害を行った。morpholino oligonucleotide をアフリカツメガエル2細胞期胚に注入した。その結果、注入胚は外見上正常に発生し孵化するものの、遊泳オタマジャクシ期に至って頭部および胴部に浮腫を生じ、大きく膨らんだ外見を呈した。光学および電子顕微

鏡による切片の観察の結果、*Xinv morpholino* 注入胚の腎臓細胞中には、正常胚では見られない未消化の卵黄顆粒が大量に残存していた。このことから、細胞が正常に分化を完了できず、腎細胞が機能していないことが示唆された。更に *Xinv* 遺伝子のクローニングおよび機能阻害実験と並行して、主にマウス *inv* を用いて、Inv タンパク質の過剰発現がアフリカツメガエルの発生におよぼす影響を調べた。マウス *inv* cDNA から *in vitro* 転写により合成した mRNA をアフリカツメガエル 2 細胞期胚に微量注入したところ、将来の右側となる割球に注入を受けた胚は左右が形態的に、また遺伝子発現パターンにおいてもランダムになることを見出した。この効果は C 末端側の IQ モチーフ (IQ2) を欠損させると失われた。これに対し、アフリカツメガエルの *inv* 関連遺伝子 (*Xinv*) から合成した mRNA を、アフリカツメガエル初期胚に注入しても左右の逆転は見られなかった。しかし IQ モチーフを改変した *Xinv* mRNA は、アフリカツメガエル 2 細胞期胚への注入により、マウス *inv* mRNA と同じく左右の逆転を引き起こした。以上の結果は、*inv* 遺伝子がアフリカツメガエルにおいても保存されており、*Nodal* 関連遺伝子等の上流に位置して左右非対称性の形成の最初期の機構に関わることを示しており、この Inv タンパク質の活性の制御にカルモジュリンの結合が関与していることを初めて明らかにした意義は大きい。このように安彦氏はツメガエルで初めて *inv* 遺伝子のクローニングと解析に成功し、それらをマウスの *inv* 遺伝子と比較するなどして *inv* 遺伝子の新しい機能ドメインを見つけた。またこの *inv* 遺伝子がカルモジュリン結合に関与していることを示した。

なお、この本論文は今井文康氏ら 5 名との共同研究であるが、論文提出者が主体となってツメガエルの *inv* のクローニングと解析、マウス *inv* の機能解析を行い、更に *inv* タンパク質の活性制御にカルモジュリン結合があることを見いだしたもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると思われる。